动 物 学 研 究 2008，Aug. 29(4)：421-426 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research doi:10.3724/SP.J.1141.2008.04421

稳定表达 HIV-1 辅助蛋白 Rev 的 THP-1 细胞模型的建立和鉴定

周慧芳[1,2]，陆小鹏[1,2]，孙正华[1,2]，郭 彦[1]，张华堂[1,*]

（1. 中科院昆明动物研究所 免疫生物学实验室，云南 昆明 650223；2. 中国科学院研究生院， 北京 100049）

摘要：Human immunodeficiency virus-1（HIV-1）辅助蛋白在其感染和艾滋病发病过程中起着非常重要的作用。Regulator of expression of virion proteins（Rev）作为 HIV-1 辅助蛋白之一，可以调节病毒结构蛋白 mRNA 出核转运和蛋白表达，对于病毒的复制至关重要。为研究 Rev 蛋白对靶细胞表型和功能的影响，本实验采用电穿孔的方法，将 HIV-1 的 rev 基因导入 THP-1 细胞，通过流式分选结合 G418 筛选的方法建立稳定表达 Rev 蛋白的细胞模型；并通过 RT-PCR、荧光观察及流式检测的方法，在 mRNA 和蛋白两个水平对所建立的细胞模型进行鉴定。结果证实 *rev* 基因成功导入了 THP-1 细胞并稳定表达，为后续 *rev* 基因产物与细胞相互作用的研究提供了平台。

关键词：Rev；THP-1；稳定表达
中图分类号：Q344.13; Q786 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853-(2008)04-0421-06

Establishment and Characterization of THP-1 Cell Model Stably Expressing HIV-1 Auxiliary Protein Rev

ZHOU Hui-fang[1,2], LU Xiao-peng[1,2], SUN Zheng-hua[1,2], GUO Yan[1], ZHANG Hua-tang[1,*]

(1. *Immunobiology Lab, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming Yunnan* 650223, *China*;
2. *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100049, *China*)

Abstract: HIV-1 auxiliary proteins play a critical role in both the infection of HIV-1 target cells and the morbidity of AIDS. Rev, as one of the HIV-1 auxiliary proteins, is essential for the replication of HIV-1. As a membrane-shuttle protein, it can regulate the transportation of HIV-1 structural protein's mRNA. The *rev* gene from HIV-1 was transfected into THP-1 cells. The Rev-stably-expressed cell model was generated by electroporation and then sorted and selected with G418. The cell model was characterized at both mRNA and protein levels with an RT-PCR assay, fluorescent observation, and flow cytometry analysis. The *rev* gene was successfully transfected into THP-1 cells and stably expressed. This is a useful result for future research of the interaction between Rev and cells.

Key words: Rev; THP-1; Stable expression

人免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus-1，HIV-1）共表达 6 种辅助蛋白, 这些蛋白对于病毒有效感染宿主、自身复制及艾滋病的形成和发病发挥着重要的作用（Frankel et al, 1998）。其中，Regulator of expression of virion proteins（Rev）对于 HIV-1 复制是必不可少的。它一方面通过自身富含精氨酸的 RNA 结合域（RNA binding domain）结合这些病毒 mRNA，另一方面由自身单体多聚化形成高度有序结构与 mRNA 上的反应元件 (Rev response element) 结合（Malim et al, 1989a；Bogerd et al, 1993），将未剪切或部分剪切的病毒 mRNA 转运出核，从而调节病毒晚期基因产物的表达（Malim et al, 1989b；Hope, 1999）。Rev 蛋白通过自身的核输入信号（nuclear leading signal）和核输出信号（nuclear export signal)序列在细胞核与细胞质中穿梭，在细胞供能和各种核内外转运因子的参与下，

收稿日期：2008-04-08；接受日期：2008-06-18
基金项目：国家自然科学基金面上项目（30771951）；中国科学院“百人计划”项目；中国科学院知识创新工程重要方向项目（KSCX1-YW-R-16）
*通讯作者（Corresponding author），E-mail: zhanght@post.kiz.ac.cn；Tel：0871-5120435
第一作者简介：硕士研究生，研究方向为 HIV/AIDS 免疫生物学机制和疗法。E-mail: olive0716@163.com

少量的 Rev 蛋白进入细胞核与其反应元件结合，加速病毒晚期蛋白 mRNA 的核外转运，同时降低它们的剪接程度，从而翻译得到 HIV-1 增殖所必需的结构蛋白（Favaro, 1998；Perales, 2005）。此外，Rev 蛋白可能还在病毒复制的其他时相扮演一定的角色。利用 gag-pol 表达载体系统转染细胞发现，HIV-1 和猴免疫缺陷病毒（simian immunodeficiency virus，SIV）来源的 Rev 蛋白能将病毒 RNA 衣壳化水平有效地提高 20－70 倍，明显促进 RNA 病毒粒子的生成，且其效应与载体的量呈正相关（Brandt et al, 2007）。

Rev 作为一种核质穿梭蛋白不仅对病毒的复制起着关键作用，而且在 HIV-1 感染过程中可能对宿主的细胞乃至整个免疫系统产生一定影响。Bobbitt et al（2003）研究证实，Rev 蛋白的活性对于细胞毒 T 淋巴细胞的杀伤功能起着决定性的作用。改变 Rev 蛋白的氨基酸序列使其活性下降，细胞毒 T 淋巴细胞的杀伤功能对于通过抗 Gag 及 Env 的杀伤作用明显降低；从无症状的病毒感染个体分离的 Rev 蛋白活性较低，Gag 表达水平也较低，细胞对于抗 Gag 的细胞毒 T 淋巴细胞的杀伤作用具有较强的耐受性。

虽然有关 Rev 蛋白的研究工作已经取得了一定的进展，但 Rev 对其他宿主细胞，如巨噬细胞（macrophages）和树突状细胞(dendritic cells)的影响目前还不清楚，Rev 蛋白与这些细胞间的相互作用未见报道。因此，建立一种稳定表达 Rev 蛋白的细胞模型，有针对性地对细胞的表型和功能进行研究，有利于理解 Rev 蛋白如何对这些宿主细胞进行调节。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

pHXBnPLAP-IRES-N+质粒由英国牛津大学徐小宁教授惠赠；pEGFP-N2 质粒由云南大学分子生物学与基因工程实验室惠赠；大肠杆菌 DH-5α 为本实验室保存；THP-1 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库；RPMI1640 培养基、胎牛血清和转染用 OPTI-MEM 培养基购自 GIBCO 公司；Qiagen Endotoxin-free 质粒大提试剂盒和 G418 购自 Invitrogen 公司；4 mm 电转杯购自 BIO RAD 公司；RNAprep 培养细胞总 RNA 提取试剂盒、TIANscript M-MLV 逆转录酶购自 Tiangen 公司；rTaq 聚合酶、DNA Marker DL2000 及其他生化常用试剂购自 Takara 公司。

LSM510 META 倒置激光共聚焦扫描电子显微镜购自德国 Zeiss 公司；FACS Vantage SE 流式细胞仪购自 BD 公司；Steri-Cycle CO_2 培养箱、SW-CJ-IB 超净工作台购自 Thermo 公司；Gene Pulser Xcell TM 电转仪购自 BIO RAD 公司。

1.2 基因扩增、质粒构建、提取和鉴定

1.2.1 *rev* 基因扩增 用 pHXBnPLAP-IRES-N+质粒作为模板，利用两次 PCR 的方法获得全长 *rev* 基因。第一次 PCR 前向引物 F1：5′-*ATCAGAACA-GTCAGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAAGCA*ACCCACCTCCCAATCCCGA-3′（斜体划线部分为第一外显子的下游 40 nt），反向引物 R1：5′-ATTGAGCAAGCTAACAGCACTATTC-3′，扩增第一外显子右侧和第二外显子直接相连的片段；第二次 PCR 前向引物 F2：5′-*ATGGCAGGAAGAAGC-GGAGACAGCGACGAAGAGCTC*ATCAGAACAGTCAGACTCATCAA-3′（斜体划线部分为外显子的上游 36 nt）与 R1 扩增全长 *rev* 序列。两次条件相同：50 µL 反应体系，94℃预变性 3 min，循环 30 次。循环条件为：94℃变性 30 s；50℃退火 30 s；72℃延伸 2 min。循环结束后 72℃延伸 10 min；将全长 *rev* 基因连接到 pMD-19T 克隆载体上，命名为 pMD-19T-REV，测序鉴定。

以 pMD-19T-REV 作为模板，前向引物 F3：5'-GAATTCATGGCAGGAAGAAGCGGA-3′(斜体划线部分是 *Eco*RI 酶切位点)，反向引物 R3：5′-GGATCC TTCTTTAGCTCCTGACTC CAA-3′(斜体划线部分是 *Bam*HI 酶切位点)，扩增条件为：50 µL 反应体系，94℃预变性 3 min，循环 30 次。循环条件为：94℃变性 30 s；53℃退火 30 s；72℃延伸 30 s。循环结束后 72℃延伸 10 min，扩增得到目的产物。

1.2.2 质粒构建、提取和鉴定 通过 *Eco*RI 和 *Bam*HI 限制性酶切位点将 PCR 产物酶切后连入表达载体 pEGFP-N2，命名为 pEGFP-N2-REV；将其转化入大肠杆菌 DH-5α 进行扩增，用 Qiagen Endotoxin-free 质粒大提试剂盒提取质粒，再用 *Eco*RI 和 *Bam*HI 限制性内切酶酶切电泳鉴定。

THP-1 细胞用含 10%胎牛血清、100 U/mL 的青霉素、100 µg/mL 的链霉素、2 mmol/L 的 L-谷氨酰胺，1 mmol/L 的丙酮酸钠的 RPMI1640 完全培养基，37℃、5%的 CO_2 培养箱中培养。

细胞生长到对数期时，1000rpm/min 离心 5min 收集细胞，用 500 μL 的 Opti-mem 重悬，调整密度至 3×10^6 个/mL，转入 4mm 的电转杯中，加入 20μg（1μg/μL）pEGFP-REV-N2 质粒，混匀，用如下条件进行电穿孔：电压 300V，电容 150μF。电穿孔完毕后用 RPMI1640 培养基洗两遍去除细胞碎片。37 ℃、5%的 CO_2 培养箱中培养。

1.4 激光共聚焦荧光显微镜观察、流式分选表达 Rev 的 THP-1 细胞

转染 24h 后直接将电穿孔的细胞在倒置激光共聚焦扫描显微镜下观察荧光蛋白的表达情况。36h 后用流式细胞仪进行分选，收集 EGFP 表达阳性的细胞继续培养。转染后 48h 开始用 500μg/mL 的 G418 进行持续筛选。细胞每隔一天换半液，并在新的培养基中加入 G418，维持其浓度为 500μg/mL，筛选至两周以上。收集 10^6 个细胞，用 PBS 洗两遍，直接通过流式细胞仪检测。使用 Zeiss LSM Data Server 和 WinMDI29 软件分别对荧光照片和流式采集的数据进行结果分析。

1.5 RT-PCR 检测 *rev* 基因的表达

1.5.1 总 RNA 提取 分别将 10^6 个 *rev* 基因的表达阳性的细胞和未转染的 THP-1 细胞 1 000 rpm/min 离心 10min 收集，去上清，细胞裂解液裂解细胞后，用 RNAprep 培养细胞总 RNA 提取试剂盒的方法进行 RNA 提取。

1.5.2 RNA 反转录 用两种细胞的总 RNA 提取物作为模板，在 0.2mL Eppendorf 管中进行反转录，获得第一条 cDNA 链：随机引物（0.5ug/μL）2 μL，总 RNA10μL，dNTPs（DEPC 水溶解）2μL，70℃，5min；冷却后，加入 5×first strand buffer 2μL，DTT 1μL，42℃，2min；加入 TIANscript M-MLV 逆转录酶 1μL，总反应体积为 20μL，25℃，10min；42 ℃，50min；95℃，5min 终止反应，冰浴冷却 5min，-80℃保存。

1.5.3 PCR 扩增 Rev 取 3μL cDNA 用于 PCR 扩增 Rev，GAPDH 基因作为内参。引物以及反应条件同 1.2.1 中酶切位点产物的扩增。

2 结 果

2.1 表达载体构建

rev 基因全长 351bp（含终止密码子 TAG），两个外显子之间由一个内含子隔开。两次 PCR 使两个外显子相连获得全长不含内含子的 Rev 序列，经过测序证实为 *rev* 基因。pEGFP-N2 质粒全长 4.7kb。扩增 *rev* 基因连入 pEGFP-N2 后（图 1），用 *Eco*RI 和 *Bam*HI 对所提质粒进行双酶切，在 250 和 500bp 之间可看到一条明显条带，证实 *rev* 基因成功地连入了 pEGFP-N2 表达载体（图 2）。

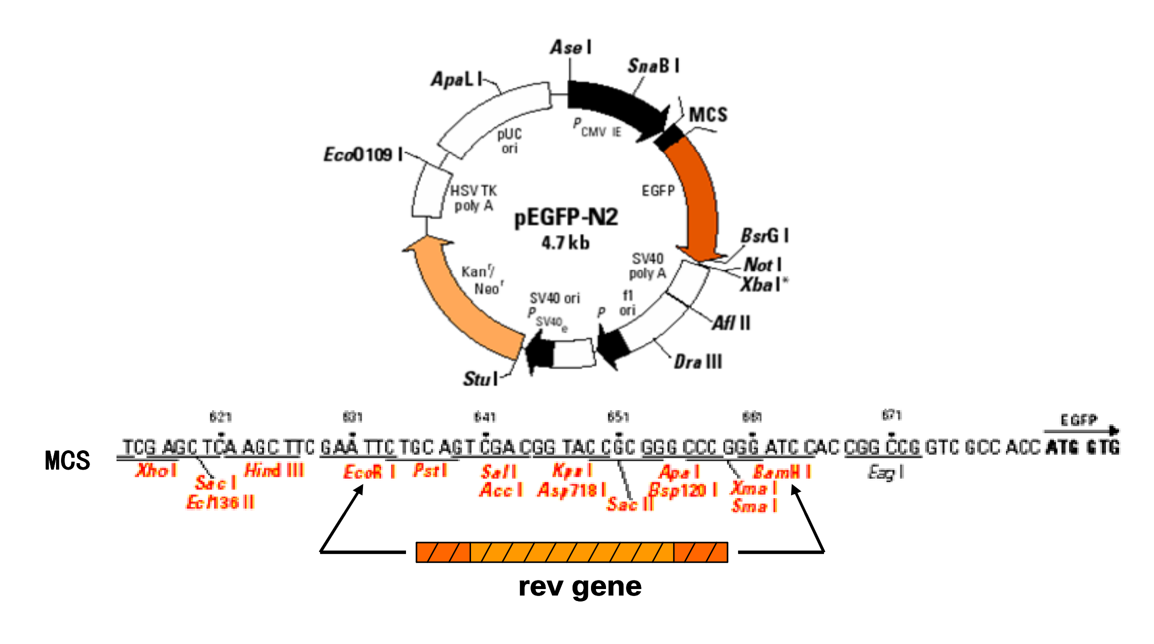


图 1 表达载体构建 pEGFP-REV-N2（载体信息来自 www.bdbiosciences.com）

Fig. 1 Construction of expression vector pEGFP-REV-N2

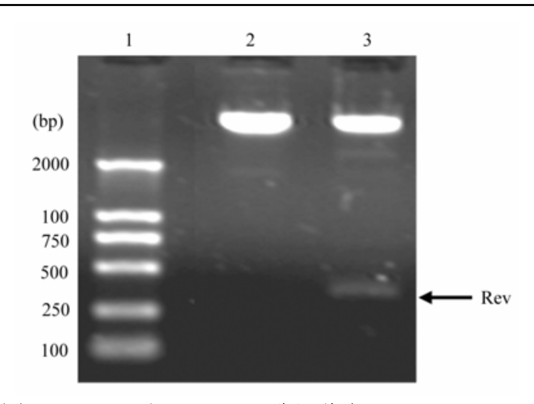


图 2 *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切鉴定 pEGFP-REV-N2 表达载体

Fig. 2 Double digestion of vector pEGFP-REV-N2 with restricted enzymes *Eco*RI and *Bam*HI

1：分子量标准 DL2000；2：pEGFP-N2 载体 *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切；3：pEGFP-REV-N2 载体 *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切。

Lane 1：Marker DL2000; Lane 2：normal pEGFP-N2 vector digested with *Eco*RI and *Bam*HI; Lane 3：pEGFP-REV-N2 vector digested with *Eco*RI and *Bam*HI.

2.2 在转染并经筛选的 THP-1 细胞中观察到融合蛋白的表达

rev 基因通过 *Eco*RI 和 *Bam*HI 酶切位点连入 pEGFP-N2 载体，与下游的 EGFP 报告基因在同一阅读框中共同表达形成融合蛋白。转染 THP-1 细胞后 24 h，直接在荧光显微镜下可观察到融合蛋白的表达（图 3b），转染效率约为 4.06%（图 4b）。流式分选后收集表达 EGFP 的细胞，用含 G418 的培养基培养两周至 3 周后出现抗性细胞。这时用荧光显微镜可观察到表达绿色荧光蛋白的细胞的比例显著提高（图 3c），流式检测阳性细胞比例达 97.07%（图 4d）。

2.3 在转染并经筛选的 THP-1 细胞中有 Rev 的 mRNA 的表达

正常 THP-1 细胞和转染 *rev* 基因后并经筛选的 THP-1 细胞在 GAPDH 表达水平相当的情况下，在后一种 THP-1 细胞中扩增到明显的条带，大小与 Rev 相符，但正常 THP-1 细胞则无目的片段存在(图 5)。表明在转染了 *rev* 基因并经筛选后，THP-1 细胞中有 Rev 的 mRNA 表达。

3 讨 论

Rev 是 HIV-1 的 6 个辅助蛋白之一，它在 HIV-1 感染靶细胞后释放到细胞中，在核膜内外穿梭，对于 HIV-1 晚期基因产物的 mRNA 出核转运、蛋白的表达、感染性病毒粒子的形成和释放发挥着至关重要的作用。在过去的二十几年中，对于 Rev 蛋白在病毒中的重要功能及其机制的研究已取得许多突破性的进展。另外，Rev 对于 CD4+T 细胞的影响的报道也相对较多，很多 Rev 功能的结果都是在 CD4+T 细胞中获得的。但其与其他宿主细胞特别是树突状细胞及其诱导前体细胞的相互作用还不清楚，许多问题还有待进一步研究。本研究通过电转染方法，首次建立了 Rev 蛋白稳定表达的 THP-1 细胞模型，可在模拟病毒感染细胞的过程中观察 Rev 释放到细胞内的状态，也可在 Rev 蛋白表达的情况下对细胞表型和功能状态的改变进行研究。

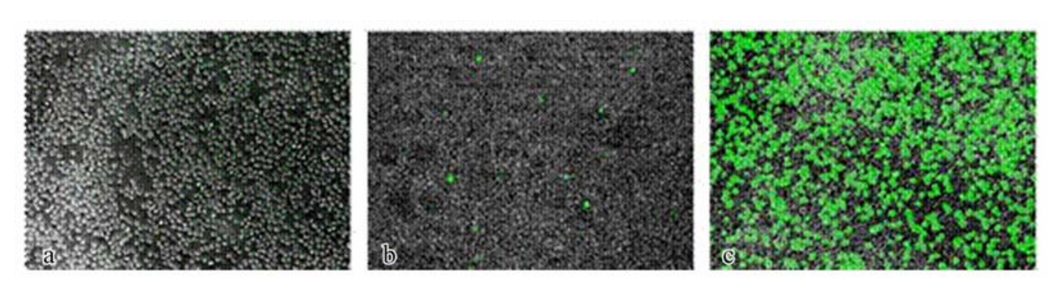


图 3 转染和筛选后 Rev-EGFP 融合蛋白的表达：激光共聚焦荧光显微镜观察 Rev-EGFP 融合蛋白

Fig. 3 Expression of Rev-EGFP fusion protein after 24hrs post-transfection and after one-month selection: Observation under the laser confocal fluorescent microscopy

a：未转染的 THP-1；b：转染后 24h；c：筛选后稳定表达 Rev 的 THP-1。

a：un-transfected THP-1 cells; b：transfected THP-1 24h post-tranfection; c：Rev-stably-expressed THP-1.

Rev 的 mRNA 产物由两个外显子组成，之间由 *env* 和 *vpu* 隔开。由于第一外显子只有 76 bp，本实验设计了两个长的前向引物，与第二外显子末端的反向引物两次 PCR 扩增，获得了不含内含子的全长序列，为下一步转染和蛋白的表达提供了条件。

电穿孔是一种有效的转染方法，与其他转染方法如磷酸钙沉淀和脂质体法相比，操作方便，成本低廉，适用于各种细胞转染。THP-1 细胞作为一种悬浮细

胞易于通过电穿孔的方法达到转染的目的。电穿孔的效率与多种因素有关，如质粒的纯度、细胞的生长状态和数量、电转的参数如电压、电容等。本实验首先用 pEGFP-N2 质粒转染 THP-1，对以上参数进行了摸索和优化。用 Qiagen Endotoxin-free 质粒大提试剂盒提取质粒转染对数期生长的细胞，电穿孔参数经过梯度比较，选择 0.3 kV、150 μF。而单核细胞的转染效率相对较低（优化后依然在 10%以下），为进一步筛选和建立稳定细胞系增加了难度。本研究采用流式细胞仪分选的方法，使融合蛋白表达阳性的细胞得到富集，再结合 G418 筛选，去除未转入抗性基因的细胞，从而成功地建立了稳定表达 Rev 的细胞模型。且将建立的稳定表达 Rev 的 THP-1 的细胞系反复冻存、复苏及传代培养后，其绿色荧光表达情况仍然稳定，进一步的 RT-PCR 结果检测到 Rev 的 mRNA 表达。

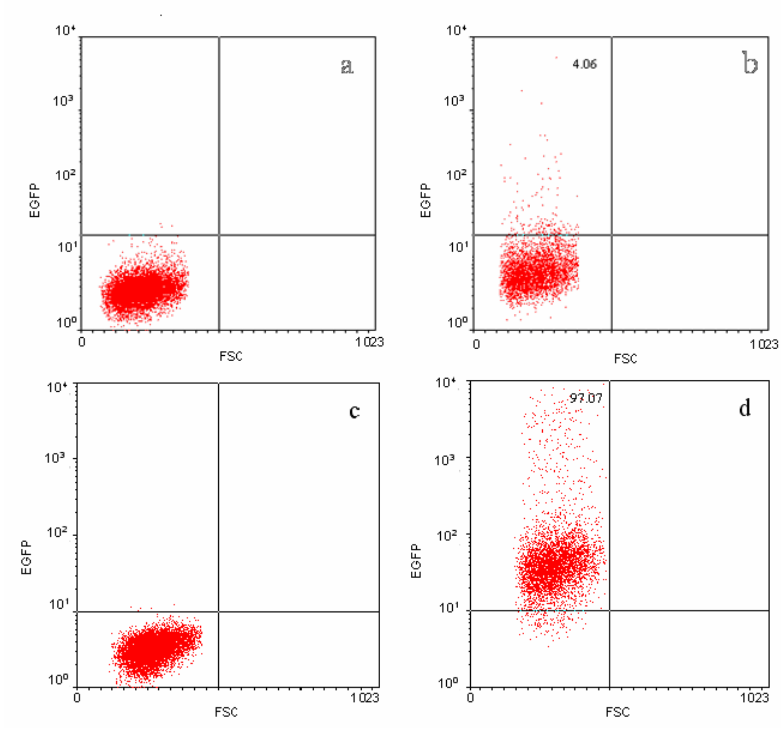


图 4　转染和筛选后 Rev-EGFP 融合蛋白的表达：流式细胞仪检测 Rev-EGFP 融合蛋白的表达

Fig. 4　Expression of Rev-EGFP fusion protein after 24 h post-transfection and after long-term selection

a：未转染的 THP-1；b：转染后 24 h；c：未转染的 THP-1；d：筛选后稳定表达 Rev 的 THP-1。

a：un-transfected THP-1 cells; b：transfected THP-1 24 h post-tranfection; c：un-transfected THP-1 cells; d：Rev-stably-expressed THP-1.

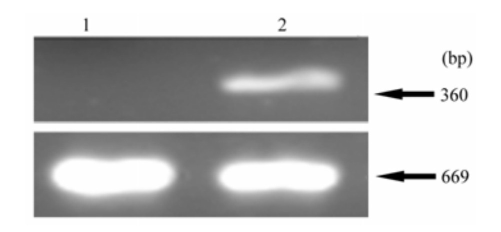


图 5　RT-PCR 分析筛选后 *rev* 基因表达

Fig. 5　Analysis of *rev* gene expression with RT-PCR assay

360 bp 条带和 669 bp 条带分别为 Rev（带有 *Eco*RI 和 *Bam*HI）和 GAPDH 的 RT-PCR 产物。1：未转染 THP-1；2：筛选后的 THP-1。

360 bp and 669 bp straps were respectively represented for the product of RT-PCR assay from rev primers and GAPDH primers. Lane 1：un-transfected THP-1; Lane 2：selected THP-1.

HIV-1 的主要靶细胞是 CD4+T 细胞，但在感染早期，其首先感染的细胞则是巨噬细胞和树突状细胞。THP-1 是一种白血病来源的单核细胞系，它可以作为巨噬细胞前体，在细胞因子 GM-CSF、IL-4、TNF-α 等联合作用下，THP-1 细胞还可以被诱导成树突状细胞（Carsten Berges et al, 2005）。选择 THP-1 细胞作为转染的模型，建立稳定表达 rev 基因的细胞系，既可以用于直接观察 Rev 蛋白对巨噬细胞前体和树突状细胞前体及其分化、成熟后表型（细胞表面标记）和功能的影响，又可用于研究感染后的树突状细胞和巨噬细胞与 CD4+T 细胞之间的相互作用、Rev 蛋白功能及其对宿主细胞乃至整个免疫系统的影响。从而为研究病毒与细胞的相互作用机制及艾滋病的预防和治疗提供了平台。

致谢：感谢昆明动物研究所中心实验室，及其他未提名的老师的无私帮助。

参考文献：

Bobbitt KR, Addo MM, Altfeld M, Filzen T, Onafuwa AA, Walker BD, Collins KL. 2003. Rev activity determines sensitivity of HIV-1-infected primary T cells to CTL killing [J]. *Immunity*, **18**: 289-299.

Brandt S, Blissenbach M, Grewe B, Konietzny R, Grunwald T, Uberla K. 2007. Rev proteins of human and simian immunodeficiency virus enhance RNA encapsidation [J]. *PLoS Pathog*, **3**(4): e54.

Bogerd H, Greene WC. 1993. Dominant negative mutants of human T-cell leukemia virus type I Rex and human immunodeficiency virus type 1 Rev fail to multimerize *in vivo*[J]. *J Virol*, **67**(5): 2496-2502.

Carsten B, Cord N, Sarah T, Hubert W, Alexandra H, Mahmoud S, Gerhard O, Volker D. 2005. A cell line model for the differentiation of human dendritic cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **333**: 896-907.

Favaro JP, Borg KT, Arrigo SJ, Schmidt MG. 1998. Effect of Rev on the intranuclear localization of HIV-1 unspliced RNA [J]. *J Virol*, **249**(2): 286-96.

Frankel AD, Young JA. 1998. HIV-1: Fifteen proteins and an RNA [J]. *Annu Rev Biochem*, **67**: 1-25.

Hope TJ. 1999. The ins and outs of HIV Rev [J]. *Arch Biochem Biophys*, **365**: 186-191.

Malim MH, Böhnlein S, Hauber J, Cullen BR. 1989a. Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator-derivation of a trans-dominant repressor of Rev function [J]. *Cell*, **58**: 205-214.

Malim MH, Hauber J, Le SY, Maizel JV, Cullen BR. 1989b. The HIV-1 *rev* trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA [J]. *Nature*, **338**: 254-257.

Perales C, Carrasco L, González ME. 2005. Regulation of HIV-1 env mRNA translation by Rev protein [J]. *Biochim Biophys Acta*, **1743**(1-2): 169-75.